

**POLIMORFISME GENETIK DARI *Anopheles barbirostris*  
KAITANNYA DENGAN PREVALENSI MALARIA DI KECAMATAN CINEAM,  
KABUPATEN TASIKMALAYA**

Amrul Munif<sup>1</sup>, M.Sudomo<sup>1</sup>, Soelaksono, S<sup>2</sup>, Maelita, R.<sup>2</sup>, dan Agus, D.P.<sup>2</sup>

***POLIMORFISME GENETIK OF Anopheles barbirostris WITH PREVALENCE OF  
MALARIA IN CINEAM REGENCY, TASIKMALAYA DISTRICT***

**Abstrac.** The level of genetic polymorphism found in An.barbirostris was obtained by employing the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method and then analyzing the patterns of DNA bands formed, some of which would be polymorphic and other monomorphic. Polymorphic DNA band frequency was calculated to obtain the percentages polymorphic of DNA bands occurring in An.barbirostris from all 10 villages. The result of DNA band pattern analysis managed to be amplified from An. barbirostris was found to contain a different number of polymorphism in each village. The highest level of polymorphism was obtained in the sample from Cikondang village (88.9%), Cijulang (81.2%) and Rajadatu (77.8%) which are both HCI areas While in MCI areas, the level of polymorphism was lower for Ciampanan (63.6%) and Nagara Tengah (69.2%) Then, for LCI villages, the result for Pasirmukti (50%). Cisarua was 50%, Cineam was 44.5%, and Ancol was 50%. The regression analysis showed the relation of genetic variation in An. barbirostris in each village with the prevalence showing positive correlation  $Y = 0.692 X + 3.2$ ,  $R = 0.58$ ,  $p > 0.05$ , in which the level of polymorphism affected the high level of malaria prevalence, either from SPR.

**Key word:** Polimorfisme genetik, RAPD, An.barbirostris, PCR, Prevalensi malaria.

## PENDAHULUAN

Variasi/polimorfisme/keanekaragaman genetik pada spesies vektor mempunyai pengaruh terhadap kapasitas vektorial (angka yang menunjukkan terjadinya transmisi) dan sifat kemampuan vektor dalam menularkan penyakit <sup>(1)</sup>. Melalui perhitungan nilai kapasitas vektorial ini, dapat diprediksi kapan terjadinya penularan, di samping berguna untuk memonitor potensi penularan <sup>(2)</sup>. Nilai kapasitas vektorial (VC) diperoleh dari beberapa parameter tertentu di antaranya sebagai berikut: (1) mengukur kepadatan vektor (m), (2) meng-

hitung kelangsungan hidup harian vektor (p), (3) kekerapan menggigit orang (a), (4) lamanya sporogony (n), dan (5) proporsi *Anopheles spp* dengan sporozoit infeksi (b) <sup>(3)</sup>. Risiko penularan malaria dihitung sebagai nilai dari kapasitas vektorial (VC) yang secara teoritis apabila VC=0,01 maka baru dapat terjadi penularan secara alami <sup>(4)</sup>. Kepadatan populasi nyamuk vektor yang tinggi disebabkan karena memiliki sifat keanekaragaman yang lebih bervariasi, sehingga nyamuk akan mudah lulus hidup dan berkembang biak dari generasi ke generasi. Sedangkan nyamuk yang tingkat polimorfismenya ku-

<sup>1</sup> Puslitbang Ekologi Kesehatan, Badan Litbangkes

<sup>2</sup> FMIPA, Institut Teknologi Bandung

rang bervariasi cenderung tidak mudah untuk lulus hidup<sup>(5,6)</sup>. Hal ini disebabkan karena adanya korelasi antara keanekaragaman dengan adaptasi untuk lulus hidup<sup>(5)</sup>. Kemungkinan lain dengan banyaknya variasi genetik pada vektor akan menyebabkan vektor tahan terhadap tekanan lingkungan. Dengan demikian daya kemampuan lulus hidup makin tinggi yang pada akhirnya populasi vektor menjadi tinggi dan prevalensi malaria meningkat<sup>(7)</sup>. Keanekaragaman di antara individu dapat terjadi karena adanya perbedaan variasi genetik, keanekaragaman genetik ini selalu ditemukan pada semua makhluk hidup<sup>(8)</sup>.

Menurut Tabachnik dan William<sup>(1)</sup> terdapat korelasi yang positif antara tingkat polimorfisme genetik pada populasi *Anopheles* dengan prevalensi malaria. Hal ini menunjukkan adanya hubungan kepadatan populasi vektor dapat diprediksi melalui pengamatan polimorfisme/variasi genetik dari desa-desa yang mempunyai tingkat prevalensi yang berbeda. Tingkat polimorfisme genetik dapat dianalisis melalui pola larik DNA dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), sehingga akan diperoleh larik-larik DNA yang bersifat polimorfisme dan monomorfisme<sup>(9,10,11)</sup>.

Secara umum peningkatan populasi nyamuk dapat terjadi karena nyamuk mempunyai daya kelangsungan hidup yang lebih tinggi. Populasi *Anopheles* yang tinggi dapat juga terjadi karena memiliki keanekaragaman individu. Metode RAPD ini untuk mengidentifikasi polimorfisme DNA secara cepat, dan dapat dengan mudah menghasilkan polimorfisme yang sangat tinggi dari DNA yang diamplifikasinya<sup>(12)</sup>. Dalam metode ini oligonukleotida

yang pendek bertindak sebagai primer melalui pengikatan daerah yang komplemen dan memulai proses amplifikasi daerah yang spesifik dari genom dengan menggunakan reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)<sup>(13,14)</sup>. Semakin banyak variasi daerah genom yang diamplifikasi oleh primer semakin tinggi pula tingkat polimorfik nyamuk vektor. Dengan adanya perbedaan dan persamaan dari pola larik DNA *Anopheles spp* yang diamplifikasi oleh setiap primer dimungkinkan untuk dapat menghitung persentase pola larik DNA yang bersifat polimorfisme dan monomorfisme<sup>(15,16,17)</sup>, sehingga dapat dihitung persentase polimorfisme genetik dari setiap *Anopheles spp*. Tingkat polimorfisme genetik pada populasi nyamuk dapat diketahui dengan menggunakan analisa DNA<sup>(18,19)</sup>. Dengan membandingkan tingkat polimorfisme DNA nyamuk vektor maka dapat diketahui keanekaragaman genetik dari nyamuk vektor<sup>(11)</sup>. Metode RAPD yang menghasilkan polimorfisme DNA dapat mengidentifikasi keanekaragaman pada individu secara langsung pada tingkat DNA<sup>(19)</sup>. Keanekaragaman atau variasi genetik juga disebut polimorfisme apabila primer mengamplifikasi daerah genom yang bervariasi, sebaliknya monomorfisme jika primer mengamplifikasi daerah genom tidak bervariasi.

Tingkat polimorfisme di antara individu dapat terwujud melalui beberapa proses yaitu: (1) perubahan nukleotida yang mencegah amplifikasi, (2) beberapa nukleotida hilang (dilesi) pada tempat pelekatan primer, (3) penambahan nukleotida (insersi) mengakibatkan daerah pelekatan primer terlalu jauh untuk mendukung terjadinya amplifikasi, (4) insersi maupun dilesi merubah ukuran produk amplifikasi. Tipe polimorfisme ini membuat penanda

RAPD cocok diterapkan dalam penelitian keanekaragaman genetik<sup>(17)</sup>. Keanekaragaman individu tersebut dapat dideteksi dengan berbagai metode di antaranya SSLPs (*Simple Sequence Length Polymorphisms*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dan RAPD<sup>(9,11,20)</sup>.

## BAHAN DAN METODA

### Prevalensi malaria

Untuk memperoleh nilai prevalensi malaria maka dilakukan pengambilan darah secara deteksi kasus pasif (*Passive Case Detection, PCD*) deteksi kasus aktif (*Active Case Detection*) dan cara MBS (*Mass Blood Survey*) dari 10 desa di Kecamatan Cineam Tasikmalaya. Pengambilan sampel darah pada manusia dengan tujuan untuk mengevaluasi persentase kehadiran *Plasmodium* yang menginfeksi manusia. Prevalensi malaria adalah persentase penduduk yang terinfeksi *Plasmodium spp* baik yang baru maupun yang lama.

### Menentukan tingkat polimorfisme genetik

#### Isolasi DNA *Anopheles*

Untuk mempelajari hubungan polimorfisme genetik *Anopheles spp* kaitannya dengan tingkat prevalensi malaria digunakan metode yang dilakukan oleh Grosberg *et al*<sup>(10)</sup>; Hill dan Crapton<sup>(15)</sup> dan Wilkerson *et al*<sup>(19)</sup>. Perhitungan untuk memperoleh persentase tingkat polimorfik dan monomorfik dari *Anopheles spp* terlebih dahulu melakukan isolasi DNA genom. Dalam penelitian ini, DNA genom diisolasi dari bagian kaki *Anopheles spp* yang ditangkap dari sepuluh desa dengan tingkat prevalensi

yang berbeda di Kecamatan Cineam, Tasikmalaya.

Proses isolasi DNA dilakukan dengan metode yang digunakan oleh Beebe dan Saul<sup>(13)</sup>, Williams *et al*.<sup>(21)</sup> Wilkerson, *et al*<sup>(19)</sup>, Gracia *et al*<sup>(16)</sup> yang dimodifikasi dengan metode yang dipakai di NAMRU-2 yaitu penambahan proteinase K ke dalam larutan buffer lisis. Sodium asetat diganti dengan amonium asetat. Volume larutan buffer lisis dikurangi dari 500 µl menjadi 100 µl sesuai dengan larutan buffer ekstraksi DNA nyamuk dengan metode (SDS). Sebanyak 100 µl larutan buffer lisis dipanaskan dalam *waterbath* 60° C selama 10 menit. *Buffer lisis* ini terdiri dari 0,2 M NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 8,25), 1 mM EDTA dan 0,5% sodium dodecyl sulfate. Pasangan kaki *Anopheles* dimasukkan ke dalam tabung volume 1,5 ml yang telah terisi 100 µl buffer lisis. Kemudian bagian kaki nyamuk dan buffer lisis digerus dengan *hand grinder* agar kaki nyamuk hancur merata. Sebanyak 1 µl 2-merkaptotanol ditambahkan ke dalamnya.

Pada tahap ini EDTA pada larutan buffer lisis berguna untuk mengikat  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$ , sehingga dapat bertindak sebagai inhibitor nuklease. Sampel divortex hingga menjadi homogen dan kemudian ditambahkan 5 µl proteinase K (20 mg/1 ml air deion). Proteinase K berguna untuk melisis protein dan melepaskan asam nukleat ke dalam larutan lisis sel. Campuran larutan diinkubasi pada suhu 55° C sampai 56° C selama dua jam. Ke dalam tabung ditambahkan 200 µl larutan TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA), untuk menghindari banyaknya DNA yang terbuang dalam proses purifikasi. Purifikasi DNA dilakukan dengan penambahan 100 µl fenol:kloroform:isoamil alkohol

(25 : 24 : 1). Campuran tersebut sebagai deproteinisasi untuk mengeluarkan protein dari asam nukleat dan isoamyl alkohol bertindak sebagai anti busa.

Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Lapisan atas dari larutan diambil dan dipindahkan ke tabung baru. Kemudian ke dalam tabung ditambahkan kembali 100 µl campuran fenol: kloroform: isoamil alkohol ( 25 : 24 : 1). Campuran larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit, kemudian fasa bagian atas dipindahkan ke tabung baru. Kemudian dilakukan penambahan 67 µl Isopropanol untuk presipitasi pada suhu -20°C selama semalam. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dibuang sehingga hanya tinggal pelet DNA. Pelet DNA dilarutkan kembali dengan 200 µl TE. (50 mM.Tris/10 mM EDTA). Presipitasi dilakukan sekali lagi dengan menambahkan 20 µl ammonium asetat (7,5 M) dan 500 µl etanol absolut dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu -20° C yang kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 500 µl etanol 70%. Pelet dikeringkan dengan *desicator* vakum selama 30 menit, selanjutnya pelet DNA dilarutkan dengan 50 µl TE. Konsentrasi yang diperoleh dari hasil ekstraksi DNA yang berasal dari kaki nyamuk tidak dihitung tetapi diamati melalui proses elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 0,8%. Pada isolasi DNA dari 3 pasang kaki dapat diperoleh sebanyak 0,5-6,5 ng DNA/individu<sup>(21)</sup>. Kebutuhan DNA genom untuk PCR sebanyak 0,3 sampai 5,0 ng<sup>(16)</sup>.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan PCR. Reaksi PCR terdiri dari dNTP, enzim *Taq*-Polimerase, buffer PCR, MgCl<sub>2</sub> , dH<sub>2</sub>O, dan primer dalam konsentrasi dan komposisi tertentu. Semua komponen reaksi PCR kecuali enzim *Taq*-polimerase dibuat dalam bentuk aliquot untuk memperkecil terjadinya kontaminasi. Masing-masing aliquot tidak lebih untuk 5 kali reaksi. Total volume reaksi PCR adalah 25 µl. DNA genom diamplifikasi dengan menggunakan primer OPE17; 5'CTACTGCCGGT3' dari produk teknologi operon, Alameda CA. Primer yang digunakan ini secara tetap untuk semua sampel *Anopheles spp* dari 10 desa. Pemilihan primer ini berdasarkan hasil produk amplifikasi yang jelas dan mudah terbaca untuk menganalisis DNA hasil amplifikasi. Sebelum tabung Eppendorf yang berisi komponen-komponen PCR dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* merk Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400, terlebih dahulu disentrifugasi selama 5 detik. Primer OPE 17 merupakan komponen penentu daerah genom yang diamplifikasi melalui reaksi PCR. Juga primer berperan menentukan berapa banyak variasi genetik yang dapat diidentifikasi. Siklus temperatur PCR yang dipakai untuk denaturasi pada temperatur 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 35°C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit dan polimerisasi akhir selama 5 menit kemudian tabung ditempatkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Total siklus yang digunakan yaitu 45 siklus<sup>(22,23)</sup>. Hasil produk PCR ini kemudian dielektroforesis.

## Elektroforesis

Hasil amplifikasi DNA dipisahkan pasangan basanya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,4% pada larutan TAE IX (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA) <sup>(5)</sup>. Sampel DNA yang telah diamplifikasi melalui reaksi PCR ditambahkan 5 µl *loading buffer* 5X selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit agar DNA bercampur dengan *loading buffer*. Sampel DNA diambil sebanyak 20 µl dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis. Ke dalam alat elektroforesis di masukkan TAE IX. Standar berat molekul yang dipakai adalah DNA "ladder" 123 pb. Kemudian alat elektroforesis dihidupkan dengan beda potensial 70 Volt selama 2,5 jam. DNA hasil amplifikasi yang telah dielektroforesis direndam larutan etidium bromida dengan konsentrasi 2 µg/ml selama 5 menit. Gel dicuci dengan akuabides selama 2 jam <sup>(18)</sup>. Pengamatan pola larik DNA dilakukan di bawah sinar ultra violet dan difoto dengan film Polaroid 667.

## Perhitungan Produk RAPD

Hasil amplifikasi dihitung berdasarkan ada atau tidaknya larik DNA. Fragmen yang ada dinilai 1 sedangkan yang tidak ada 0. Untuk menganalisis data ini digunakan program NTSYS-pc dengan analisis secara kualitatif dan kuantitatif, berat molekul larik hasil amplifikasi dihitung pasangan basanya dengan berpedoman pada migrasi DNA standar (DNA ladder 123 pb) <sup>(22,24)</sup>.

## Perhitungan Pola Larik DNA

Untuk memperoleh komposisi dari persentase pola larik DNA pada *Anopheles* dihitung melalui kehadiran pola lariknya.

Larik DNA yang selalu muncul pada semua sampel *Anopheles spp* yang dibandingkan disebut larik DNA yang monomorfik. Sebaliknya larik DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel *Anopheles spp* yang dibandingkan disebut larik DNA yang polimorfik <sup>(25)</sup>. Perhitungan persentase pola larik DNA monomorfik dan polimorfik dilakukan dengan cara yaitu: membandingkan pola larik DNA monomorfik dan polimorfik antara sampel nyamuk pada nyamuk antar desa yang bersangkutan, masing-masing desa diambil dua sampel *Anopheles* dengan masing-masing *Anopheles spp* dalam setiap perlakuan dan dihitung persentasenya. Juga Perbandingan pola larik DNA monomorfik dan polimorfik berdasarkan keseluruhan sampel. Perbandingan dilakukan dengan menghitung semua larik yang selalu hadir dan tidak hadir pada keseluruhan sampel *Anopheles*. Dengan cara ini diperoleh persentase pola larik DNA dari masing-masing spesies di setiap lokasi. Persentase pola larik DNA dari masing-masing spesies pada setiap lokasi dapat diperhitungkan dan dikorelasikan dengan tingkat prevalensi dalam hal ini sediaan darah positif (*Slide Positif Rate, SPR*) di setiap desa.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Polimorfisme genetik

#### Produk Amplifikasi DNA *Anopheles barbirostris*

Tingkat polimorfisme diperoleh dari kehadiran larik-larik DNA yang tidak selalu ditemukan pada seluruh individu yang diamati. Sebaliknya larik DNA yang selalu ditemukan dan konstan pada semua individu merupakan larik non polimorfik atau disebut juga monomorfisme. Sedangkan larik DNA yang polimorfik untuk tingkat spesies, kalau larik itu hanya ditemukan pada spesies tersebut dan pada

spesies lain tidak ditemukan. Namun jika membandingkan larik DNA dari individu dalam spesies yang sama, maka larik yang selalu ditemukan pada semua anggota spesies tersebut biasanya dilakukan untuk mengidentifikasi anggota spesies tersebut.

Perhitungan polimorfisme secara kualitatif dilakukan dengan menganalisis semua larik DNA yang diperoleh dari hasil amplifikasi. Tingkat polimorfisme diantara dua individu diskor atas dasar ditemukan atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi. Untuk memperoleh ukuran larik DNA yang telah diamplifikasi dilakukan perhitungan dengan analisis regresi. Pada salah satu PCR sampel *An. barbirostris* yang berasal dari Nagara Tengah tidak ditemukan larik DNA. Kejadian ini mungkin disebabkan akibat tidak adanya DNA template atau karena dilesi dan insersi pada tempat pelekatan primer. Insersi DNA dapat mengakibatkan perubahan ukuran dari fragmen DNA, melalui perubahan basa sederhana maupun yang terikat pada fragmen DNA.<sup>(10)</sup>

Pada elektroferogram hasil PCR menggunakan primer OPE 17 terdapat larik DNA hasil amplifikasi antara 0,38 kb sampai 1,66 kb (Gambar 1 dan Tabel 1). Pemakaian primer OPE 17 terhadap sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Pasirmukti menghasilkan larik yang monomorfik, yaitu yang berukuran 0,42 kb, 0,46 kb, 0,51 kb, 0,72 kb dan 0,92 kb. Pada sampel *An. barbirostris* desa Cikondang ditemukan larik yang berukuran antara 0,46 kb-0,92 kb, dengan larik monomorfik pada ukuran 0,57 kb. Sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Radjadatu diperoleh larik berukuran diantara 0,38 kb-1,30 kb dengan larik monomorfik 0,57 kb dan 0,72 kb. Larik monomorfik ini berguna untuk identitas spesies sebagai penanda genetik<sup>(26)</sup>.

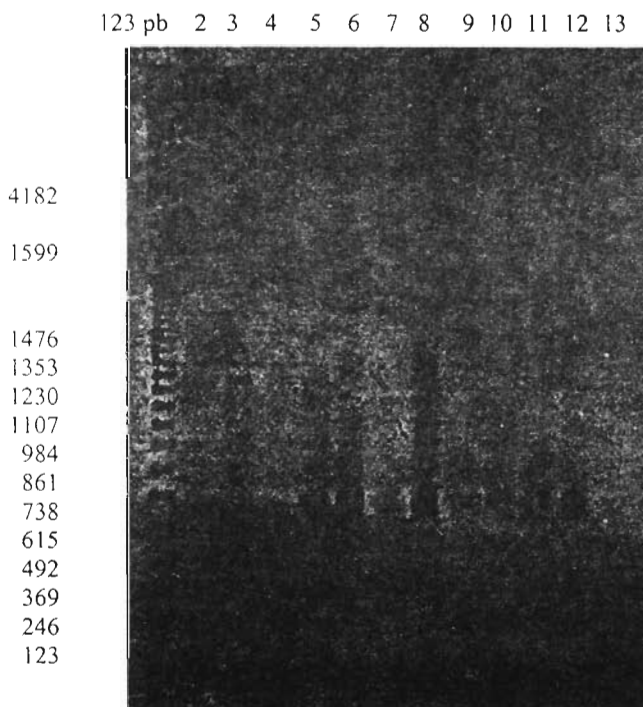
Sampel *An. barbirostris* mempunyai larik-larik DNA dengan ukuran yang berbeda pada elektroferogram menunjukkan lokus yang berbeda pula. Menurut Grosberg *et al*<sup>(10)</sup> bahwa intensitas larik-larik tersebut dapat bervariasi akibat variasi dalam hal jumlah kopi lokus yang diamplifikasi melalui kombinasi *template primer*. Hasil amplifikasi sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Ciampnan mempunyai larik yang berukuran diantara 0,57 kb-1,50 kb dengan monomorfik pada ukuran 0,57 kb, 0,63 kb, 0,76 kb dan 1,02 kb. Sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Cineam mempunyai larik-larik DNA hasil amplifikasi diantara 0,57 kb sampai 1,36 kb, dengan ukuran larik yang sama pada sampel lainnya yaitu 0,57 kb, 0,63 kb, 0,69 kb, 0,76 kb dan 0,92 kb. Sampel *An. barbirostris* yang berasal dari Nagara Tengah diperoleh produk amplifikasi pada ukuran larik diantara 0,52 kb-0,72 kb.

Hasil pemeriksaan larik DNA pada sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Cisarua, Ancol, Mediasari, Nagara Tengah, Pasirmukti dan Cijulang dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2 dengan larik amplifikasi diantara 0,26 kb- 1,57 kb. Hasil PCR pada sampel *An. barbirostris* dari desa Ancol memperoleh larik DNA berukuran diantara 0,40kb-1,10 kb, larik yang berukuran sama ditemukan pada individu lain berukuran 0,42 kb, 0,47 kb, 0,52 kb, 0,63 kb, 0,77 kb dan 0,86 kb. *Anopheles barbirostris* yang berasal dari desa Cisarua diperoleh larik yang berukuran diantara 0,26 kb -0,38 kb, larik yang mempunyai ukuran sama pada larik 0,35 kb dan 0,38 kb (Gambar 2). Sedangkan hasil PCR sampel asal Mediasari menghasilkan larik yang berukuran diantara 0,26 kb-1,42 kb dengan ukuran larik yang sama pada 0,70 kb, 0,77 kb, 0,86 kb, 0,90 kb, dan 0,95 kb. Hasil pemeriksaan larik DNA pada sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Ciju-

lang dengan larik amplifikasi diantara 0,57 kb-1,57 kb. Nyamuk asal desa ini menghasilkan larik monomorfik pada ukuran 0,57 kb dan 0,7 kb. *Anopheles barbirostris* yang berasal dari desa Pasirmukti dengan larik amplifikasi diantara 0,42 kb-1,42 kb. Nyamuk asal desa ini mempunyai larik DNA yang berukuran yang sama pada 0,52 kb, 0,57 kb, 0,70 kb dan 0,77 kb. *Anopheles barbirostris* yang berasal dari desa Nagara Tengah dengan larik amplifikasi diantara 0,32 kb-0,86 kb, dengan larik monomorfik pada ukuran 0,38 kb, 0,42 kb dan 0,57 kb. Dari hasil ini diperoleh persentase tingkat polimorfisme tertinggi

ditemukan pada sampel nyamuk *An. barbirostris* berasal dari desa Cikondang (88,9%), Cijulang (81,8%) dan Radjadatu (77,8%). Terjadinya perbedaan tingkat polimorfisme tersebut karena primer mengamplifikasi DNA genom yang bervariasi. Semakin banyak variasi daerah DNA genom yang diamplifikasi oleh primer semakin tinggi juga tingkat polimorfisme suatu organisme<sup>(10)</sup>. *Anopheles barbirostris* dari desa Cikondang, Cijulang dan Rajadatu memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi dibanding sampel nyamuk dari desa Pasirmukti, Cisarua dan Ancol.

DNA Ladder



**Gambar 1. Elektroferogram Hasil PCR dengan Primer OPE 17 pada *An. barbirostris* Berasal dari Enam Desa.**

Keterangan : Kolom 1 DNA Ladder 123 pb; 2-3 Sampel Pasirmukti, 4-5 Cikondang; 6-7 Rajadatu 8-9 Ciampanan, 10-11 Cineam ; 12-13 Nagara Tengah

**Tabel 1. Pengamatan Larik DNA pada *An. barbirostris* dari Enam Desa Berdasarkan Ada atau Tidaknya Larik yang Diampifikasi dengan Primer OPE 17**

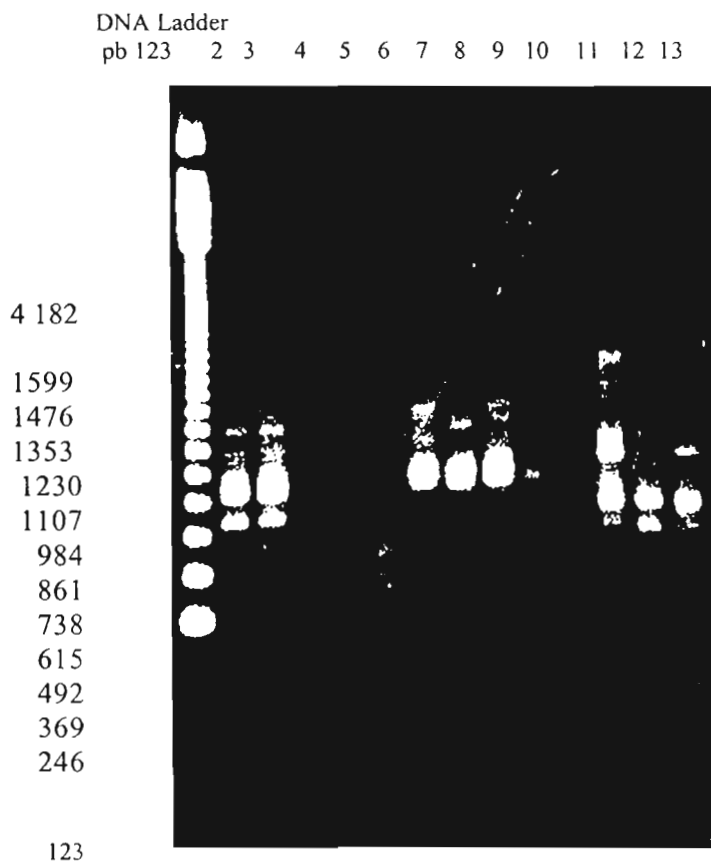
Larik DNA (kb)	Sampel <i>An. barbirostris</i>											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1,66	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,50	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,36	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1,30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1,29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,24	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1,17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1,12	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1,02	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0,92	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
0,84	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
0,79	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0,76	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
0,72	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
0,69	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0,66	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0,63	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0,60	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,57	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0,52	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
0,47	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0,45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0,42	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,38	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: 2-3 sampel Pasirmukti, 4-5 sampel Cikondang, 6-7 sampel Rajadatu, 8-9 sampel Ciampanan, 10-11 sampel Cineam, 12-13 sampel Nagara tengah.  
Skor 1 = adanya larik DNA ; Skor 0 = tidak ada larik DNA



Keanekaragaman atau variasi genetik tersebut disebabkan karena hilangnya beberapa urutan gen akibat adanya seleksi, mutasi, perkawinan dan pertemuan dua populasi<sup>(9)</sup>. Desa yang mempunyai polimorfisme tinggi mempunyai geografis yang berbeda, sehingga populasi satu atau bebe-

rapa urutan DNA yang mengakibatkan urutan DNA nyamuk *An. barbirostris* menjadi bervariasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kambhupati *et al*<sup>(27)</sup> bahwa isolasi geografis menyebabkan perbedaan DNA itu sendiri bagi spesies yang sama.



**Gambar 2. Elektroferogram Hasil PCR dengan Primer OPE 17 pada *An. barbirostris* Berasal dari Lima Desa.**

Keterangan: Kolom 1 DNA Ladder 123 pb; 2-3 Ancol 4-5 Cisarua; 6-7 Mediasari; 8-9 Cijulang; 10 - 11 Pasirmukti; 12-13 Nagara Tengah

**Tabel 2. Pengamatan Larik DNA pada *An. barbirostris* Berasal dari 6 Desa Berdasarkan Ditemukan atau Tidaknya Larik yang Diamplifikasi dengan Primer OPE 17**

Larik DNA	Sampel <i>An. barbirostris</i>												
(kb)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1,57	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1,42	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	
1,28	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
1,15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1,10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1,05	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
0,95	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	
0,90	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
0,86	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	
0,81	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,77	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
0,70	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
0,63	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
0,57	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
0,52	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
0,47	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
0,42	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
0,40	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
0,38	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
0,35	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
0,32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0,28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,26	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

**Keterangan:** 2-3 sampel Ancol; 4-5 sampel Cisarua; 6-7 sampel Mediasari; 8-9 sampel Cijulang; 10-11 sampel Pasirmukti; 12-13 Nagara tengah  
**Skor 1** = adanya larik; **skor 0**= tidak ada larik

### Hubungan Tingkat Polimorfisme dengan Prevalensi Malaria

Tingkat polimorfisme genetik dari *An. barbirostris* ditemukan selalu tinggi, sehingga ada kecenderungan untuk lulus hidup (*survival*) tinggi pada tingkat polimorfisme tinggi. Hal ini sesuai hasil penelitian Roderick,<sup>(5)</sup> dan William *et al*<sup>(21)</sup> bahwa kepadatan populasi nyamuk vektor yang tinggi disebabkan karena memiliki sifat keanekaragaman yang lebih bervariasi sehingga nyamuk akan mudah lulus hidup dan berkembang dari generasi ke generasi.

Sedangkan nyamuk yang tingkat polimorfismenya kurang bervariasi cenderung tidak mudah lulus hidup. Tingkat polimorfisme genetik dari *An. barbirostris* berpengaruh terhadap prevalensi malaria. Karena mudah lulus hidup dan berkembang maka populasi akan tinggi, tingginya populasi akan memberikan peluang dan menentukan derajat kontak gigitan nyamuk yang infeksi terhadap manusia<sup>(26)</sup>. Dengan adanya peluang *An. barbirostris* untuk menularkan malaria maka tingkat prevalensi akan meningkat. Perbedaan dan persamaan dari larik DNA pada spesies *An. barbirostris* hasil amplifikasi dengan primer OPE 17 memungkinkan untuk dapat dihitung persentase larik DNA yang polimorfik dan monomorfik melalui kehadiran lariknya.

Tabel 3 memperlihatkan hubungan antara tingkat polimorfisme dengan prevalensi malaria (SPR) di setiap desa. Desa Cisarua, Pasirmukti dan Cikondang merupakan sumber gametosit yang setiap tahunnya termasuk daerah SPR yang tinggi. Namun pada tahun 1999 hanya ditemukan dua desa dengan "SPR tinggi" yaitu Cikondang dan Cijulang dengan SPR masing-masing 22,7% dan 31,2%. Desa yang dikelompokkan dalam strata "SPR sedang" yaitu desa Ciampa-

nan (21,7%) Rajadatu (23,2%) dan Ancol (20,1%), sedangkan yang SPR rendah yaitu desa Cisarua (6,5%), Cineam (2,6%) dan Nagara Tengah (3,8%). Secara geografis desa Cikondang dan Cijulang ini saling berdekatan sehingga mempunyai tipe lingkungan hampir sama dengan ketinggian untuk Pasirmukti mencapai 680 m dari permukaan laut (dpl) sedangkan Cikondang 600 m dpl dan Cisarua tertinggi mencapai 750 m dpl.

Berdasarkan perbandingan presen-tase larik DNA yang monomorfik dan polimorfik antar individu *An. barbirostris* dalam setiap lokasi terlihat bahwa tingkat polimorfisme larik sampel nyamuk menunjukkan tingkat polimorfisme berbeda-beda yaitu; desa Cikondang (88,9%), Cijulang (81,8%), Cisarua (50 %), Pasirmukti (50%), Rajadatu (77,8%), Mediasari (64,3%), Ancol (50%), Ciampanan (63,6%), Cineam dan (44,5%), Nagara Tengah (69,2%). Tingkat polimorfisme genetik yang tinggi ternyata merupakan daerah dengan strata "SPR tinggi" pula pada tahun 1999. Karena tingginya tingkat polimorfisme dapat memprediksi keadaan tingkat populasi vektor yang tinggi sehingga memberikan peluang yang besar nyamuk dapat kontak untuk menggigit manusia. Menurut Tabachnick dan Black<sup>(1)</sup> bentuk variasi genetik dalam spesies vektor juga berpengaruh terhadap kapasitas vektorial dan *vector competence*. Hasil pengamatan larik DNA dari *An. barbirostris* yang berasal dari desa yang berdekatan memiliki tingkat persentase polimorfisme hampir sama. Kemungkinan ini karena masih dalam jangkauan distribusi nyamuk dalam melakukan aktivitasnya.

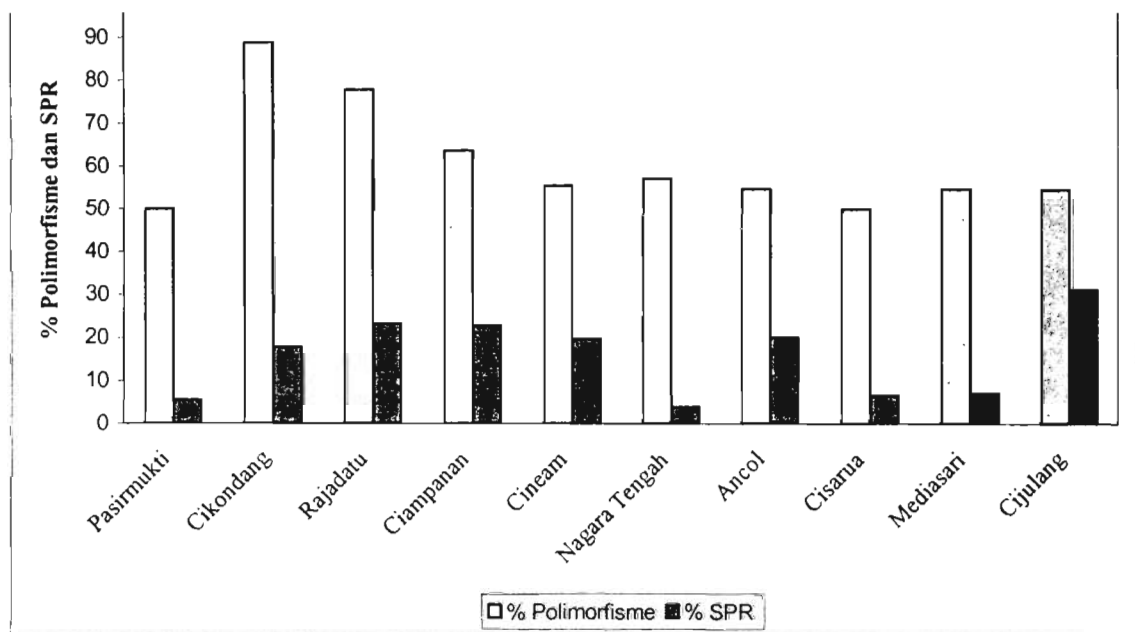
Sedangkan tingkat polimorfisme sampel nyamuk *An. barbirostris* yang berasal dari daerah dengan strata "SPR

sedang” masing-masing mempunyai tingkat polimorfisme 63,6% desa Ciampanan dan 69,2% desa Nagara Tengah. Tingkat polimorfisme terendah ditemukan pada sampel nyamuk *An. barbirostris* yang berasal dari desa Pasirmukti (50%), Cisarua (50%) dan Cineam (44,5 %). Hasil penelitian menunjukkan dimana tinggi rendahnya SPR akan diikuti dengan meningkat dan menurunnya persentase polimorfisme genetik dari *An. barbirostris*. Hubungan variasi genetik pada *An. barbirostris* yang dibandingkan berdasarkan seluruh lokasi sampel nyamuk dengan prevalensi malaria (SPR) pada setiap desa di Kecamatan Cineam tertera dalam Gambar 3 yang memper-

lihatkan tingkat polimorfisme akan diikuti tingkat prevalensi malaria (SPR) di masing-masing desa pengamatan.

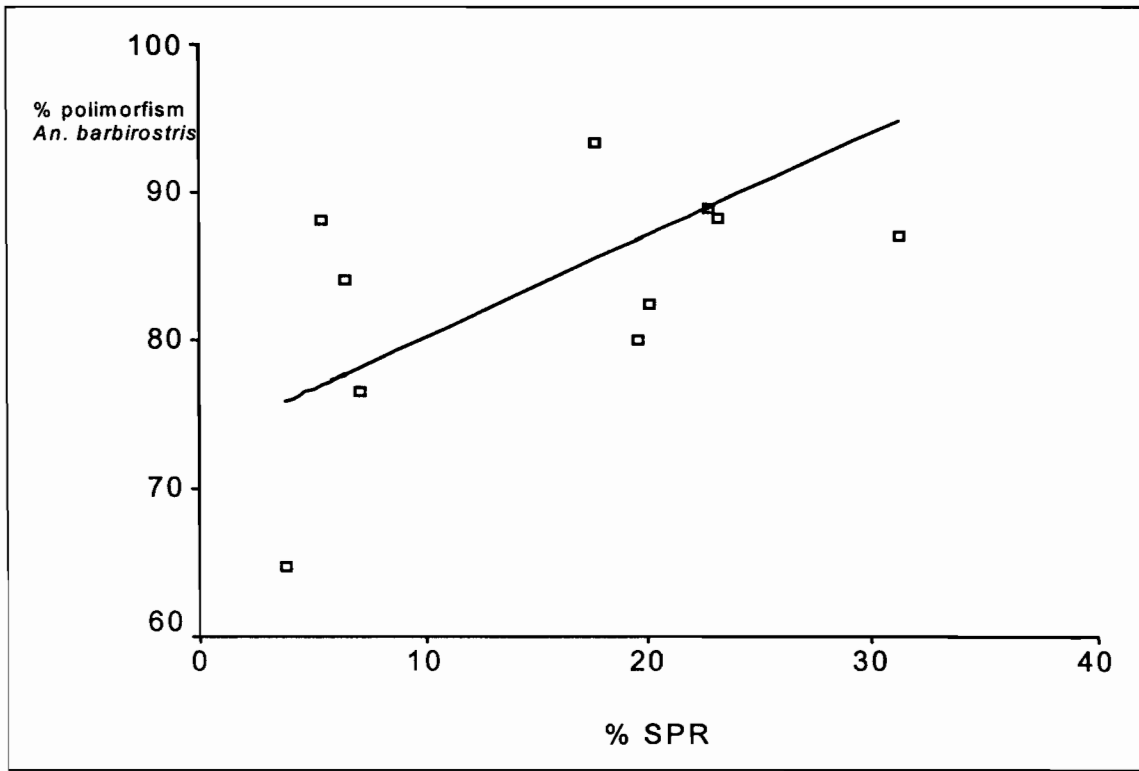
Hasil analisis regresi diperoleh persamaan hubungan antara tingkat polimorfisme genetik pada *An. barbirostris* yang dibandingkan seluruh lokasi sampel dengan prevalensi malaria (SPR) adalah  $Y = 0,692x + 3,2$ ,  $r = 0,58$ ,  $P > 0,05$ , makin tinggi tingkat polimorfisme maka makin tinggi pula persentase SPR (Gambar 4).

Kejadian tersebut di atas tentunya ada keterkaitan antara tingkat populasi *An. barbirostris* dengan tingkat polimorfisme.



**Gambar 3. Hubungan yang Menunjukkan Tingkat Polimorfisme Genetik dari *An. barbirostris* dengan Prevalensi (SPR) Malaria di Kecamatan Cineam, Tasikmalaya.**

Keterangan : % polimorfisme = jumlah larik yang hadir pada semua sampel di desa yang sama



**Gambar 4. Regresi yang Menunjukkan Hubungan Antara Tingkat Polimorfisme Genetik *An. barbirostris* yang Dibandingkan Seluruh Lokasi Sampel dengan Prevalensi Malaria (SPR) di Kecamatan Cineam, Tasikmalaya.**  
 $Y = 0,692 X + 3,20 : R = 0,578 (P > 0,05)$

Tingkat polimorfisme genetik pada *Anopheles* dapat memprediksi tingginya populasi nyamuk. Hasil penelitian menunjukkan *An. barbirostris* mempunyai tingkat populasi paling tinggi pada setiap bulan maupun pada setiap lokasi penelitian. Dengan tingginya populasi *An. barbirostris* tentunya dipengaruhi oleh keadaan variasi/polimorfisme genetik karena spesies yang mempunyai keanekaragaman yang tinggi akan menyebabkan tahan terhadap guncangan lingkungan sehingga dapat sukses hidup (*survive*) dan pada akhirnya tingkat populasi menjadi tinggi. Tingginya tingkat populasi ini akan memberikan peluang yang cukup untuk menghisap darah

manusia. Pada saat menghisap darah manusia parasit masuk ke tubuh nyamuk dan berkembang biak sampai mencapai bentuk parasit yang infeksi (sporozoit). Hal ini juga tergantung dari umur nyamuk. Bila umur nyamuk pendek maka *Plasmodium* tidak dapat berkembang lebih lanjut sehingga nyamuk tersebut tidak mungkin sebagai vektor malaria. Kajian hubungan tingkat polimorfisme genetik dengan prevalensi malaria, tingkat polimorfisme genetik dari *An. barbirostris* ditemukan selalu tinggi pada daerah dengan SPR tinggi.

Kepadatan populasi nyamuk vektor yang tinggi disebabkan karena memiliki sifat keanekaragaman yang lebih bervariasi,

**Tabel 3. Hubungan Tingkat Polimorfisme Genetik *An. barbirostris* dengan Prevalensi Malaria di Setiap Desa, Kecamatan Cineam ( Tahun 1999 S/D 2000)**

No	Desa	Jumlah larik monomorfik (%)	Jumlah larik polimorfik (%)	SPR Malaria
1.	Pasirmukti	5 (50)	5 (50)	5,9
2.	Cikondang	1 (11,1)	8 (88,9)	22,7
3.	Rajadatu	2 (22,2)	7 (77,8)	23,2
4.	Ciampanan	4(36,4)	7 (63,6)	21,7
5.	Cineam	5(55,5)	4 (44,5)	2,6
6.	Nagara Tengah	4 (30,8)	9 (69,2)	3,8
7.	Mediasari	5 (35,7)	9 (64,3)	7,1
8.	Ancol	6 (50)	6 (50)	20,1
9.	Cisarua	2 (50)	2 (50)	6,5
10	Cijulang	2 (18,2)	9 (81,8)	31.2

sehingga nyamuk akan mudah lulus hidup dan berkembang dari generasi ke generasi <sup>(6,5)</sup>.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan hasil analisis pola larik DNA yang berhasil di amplifikasi dari *An. barbirostris* terdapat jumlah polimorfisme yang berbeda di setiap desa. Tingkat polimorfisme genetik dari *An. barbirostris* tertinggi ditemukan nyamuk yang berasal dari desa Cikondang (88,9%) dan Cijulang (81,2%) dan Rajadatu (77,8%), ketiganya merupakan desa dengan tingkat SPR tinggi. Analisa regresi menunjukkan hubungan variasi genetik pada *An. barbirostris* dengan prevalensi malaria memperlihatkan korelasi positif dengan persamaan regresi  $Y = 0,692 X + 3,2$ ,  $R = 0,58$ ,  $p > 0,05$ , dimana tingkat polimorfisme berpengaruh terhadap tingginya tingkat prevalensi malaria (SPR). Tingkat polimorfisme tinggi maka makin tinggi pula tingkat prevalensi (SPR). Kejadian ini didukung dari hasil perhitungan kapasitas vektorial, kemampuan

hidup harian, kepadatan populasi dan hasil uji ELISA.

Evaluasi dari hasil elektroferogram dengan menggunakan primer OPE 17 terhadap *An. barbirostris* menunjukkan larik DNA amplifikasi diantara 0,38-1,6 kb. Larik berukuran 0,56 kb selalu ditemukan pada sampel yang berasal dari desa lainnya. Hasil pemeriksaan larik DNA pada sampel *An. barbirostris* yang berasal dari desa Cisarua, Ancol, Mediasari dan Cijulang dengan larik amplifikasi diantara 0,25-1,9 kb. *An. barbirostris* dari desa Cisarua diperoleh larik DNA amplifikasi berukuran 0,35 kb-0,4 kb, larik ini selalu ditemukan pada setiap individu. *Anopheles barbirostris* yang berasal dari desa Ancol mempunyai larik monomorfik 5 larik dengan ukuran 0,70 kb selalu diketemukan pada sampel asal Cijulang, Mediasari dan Nagaratengah merupakan larik yang monomorfisme.

Persentase tingkat polimorfisme tertinggi ditemukan *Anopheles barbirostris* yang berasal dari desa Cikondang, Cijulang dan Rajadatu. Tingkat polimorfisme terendah ditemukan pada *An. bar-*

*birostris* berasal dari desa Pasirmukti dan Cisarua. Hubungan tingkat polimorfisme genetik dengan prevalensi malaria menunjukkan hubungan korelasi positif dimana tingginya polimorfisme *An. barbirostris* diikuti tingginya SPR.

Tingkat polimorfisme genetik dari *An. barbirostris* ditemukan lebih bervariasi dibandingkan dengan *An. aconitus*, sehingga ada kecenderungan untuk lulus hidup (*survival*) tinggi pada tingkat polimorfisme tinggi. Kepadatan populasi nyamuk vektor yang tinggi disebabkan karena memiliki sifat keanekaragaman yang lebih bervariasi, sehingga nyamuk akan mudah lulus hidup dan berkembang dari generasi ke generasi. Populasi vektor yang tinggi memberikan peluang nyamuk menggigit yang tinggi pula sehingga transmisi dapat berlangsung

#### DAFTAR RUJUKAN

1. Tabachnick, W.J. and William, C.B., Population genetics in vector biology. Paper Training Course, The Biology of Disease vectors, New Delhi. 1998, 417- 437.
2. Dietz, R., Mathematical Models for Transmission and Control of Malaria. Churc-hill, Livingstone, 1998, 1052-1133.
3. Wernsdorfer, W.H. and Megregor, I.S., Malaria Principles and Practice of Malariology 2, Churchill-Livingstone. New York, 1998.
4. WHO. (1975) Manual on Practical Entomology in Malaria, Part 1., Geneva.
5. Roderick, G. K. ,Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. Ann.Rev. Entomol. 1996, 41 , 325 - 352.
6. Wiliam, C., Black Nancy, H., RAPD-PCR and SSCP analysis for Insect Population Genetic Studies Molecular Biology of Insect Disease Vectors, Chapman and Hall, 1997.
7. Wallis, G.P., Tabachnick, W.J., Powell, J.R., Genetic heterogeneity among Caribbean "Population of *Aedes aegypti*, Am.J. Trop.Med.Hyg, 1984, 33(3) ; 492 - 498.
8. Nusantara, S., Fujie, M., Yamada, T., Malek, W., Inaba, M., Kaneko, Y and Yoshikatsu, M., Phylogenetic position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, a symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan. J.Bio.Bioengineering, 1999, 87 (1), 49-53
9. Haymer, B.S., Genetic analysis of laboratory and wild strain of the melon fly (Diptera: Tephritidae) using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction, Ann. Entomol. Soc, 1995, 88 (5) , 705-710.
10. Grosberg, R.K., Levitan, D.R., Cameron, B.B., Characterization of genetic structure and Genealogies using RAPD-PCR markers: A random primer for the Novice and Nervous, in Ferraris, J.D., Palumb, S.R., Molecular Zoology, Advances, Strategies and Protocols, John Willey & Sons, Inc. Pub, New York, 1996, 67 -132.
11. Schriefer, M.E., Sacci, J.B., Wirth, R. A., and Azad, A. F., Detection of polymerase chain reaction amplified malaria DNA in infected blood and individual mosquitoes. Exp. Parasitol., 1991, 73 , 31 -316.
12. Hugh, G.G. and Annette, M.G. PCR Technology Current Innovations. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. 1994,
13. Beebe, N.W. and Saul, A., Discrimination of All Members of *Anopheles punctulatus* complex by Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Am.J.Trop. Med. Hyg, 1995, 478-481.
14. Kambhupati, S., Black, W.C. and Rai, K.S., Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito Species and population (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical Analysis and Application, J. Med. Ento., 1996, 29 (6 ) 939-949.
15. Hill, S. M and Crapton, J.M., DNA based methods for the identification of insect vectors, Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1994, 88 (3) , 227-254.
16. Garcia, A.I., Corrasco, H.I., Scholfield, C.J., Russell, J., Frame, I.A., Valents, A.S. and Mils, M., Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bug (Hemiptera: Reduviidae). J.Med. Entomol., 1998 35 (1) , 38-45.
17. Leslie, A.R., Ecological genetics. Princeton University Press, New Jersey. 1994

18. Hill, S. M., Urwin, R., Knapp, T.F. and Crampton, J. M., Synthetic DNA probes for the identification of sibling species in the *Anopheles gambiae* complex. 1991
19. Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Klern, T.A., Diagnosis by random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera : Culicidae) from Paraguay, Argentina, J.Med.Entomol, 1993, 32 (5), 697-704.
20. Walton, C.J., Hanley, C., Kuvangkadilok, F.H., Collin, R.E., Haebach, V., Baimai, N. and Butlin, R. K., Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele specific Polymerase Chain Reaction. Medical and Veterinary Entomology. 1999, 13, 24-32.
21. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nuc. Acids Res., 1990, 18 (22), 6531-6534
22. Yuwono, T. Petunjuk Laboratorium Reaksi rantai Polimerase. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. 1998,
23. Beebe, N.W., Foley, H.D., Saul, A.L., Bryan, J.H. and Burkot, T., DNA probe for identifying members of the *An.punctulatus* Complex in Papua, New Guinea. Am.J.Med.Hyg. 1994, 50, 229-234.
24. Wilkerson, R.C., Parsons, T.S., Albright, D.G., Klein, T.A. and Braun, M.J., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish Cryptic mosquito Species (Diptera : Culicidae: *Anopheles*), Insect Molecular Biology. 1, 1993, (4), 205-211
25. Scott, J.A., Brogdon, W.G. and Collin, F.H., Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by Polymerase Chain Reaction.. Am J. Trop. Hyg., 1993, 49 (4), 520-529.
26. Gilles, H. M., and Warrel, D. A., Bruce-Chwaatt's Essential Malariology. Third Edit. Edward Arnold. London, Boston Melbourne Auckland., 1993, 12-34.
27. Kambhupati, S, Black, W.C. and Rai, K.S.. Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito species and population (Diptera; Culicidae). Techniques Statistical Analysis and Application, J.Med.Ento, 1966, 29 (6) 939-949